体外法研究脂多糖对瘤胃发酵的影响

唐志文[1] 蒋林树[2] 杨 亮[1] 王 坤[1] 熊本海[1*]

（1.中国农业科学院，北京畜牧兽医研究所，动物营养学国家重点实验室，北京 100193；

2.北京农学院，奶牛营养学北京市重点实验室，北京 102206）

摘 要：本试验旨在通过体外法研究脂多糖（LPS）对瘤胃发酵的影响。选取 4 头健康、体况相近、安装有永久性瘤胃瘘管的荷斯坦奶牛用于瘤胃液的采集。试验分为对照组（不添加 LPS）和试验组（添加 LPS 100 000 EU/mL），分别在发酵 2、4、8、12、24 h 后取样，测定发酵液 pH 及挥发性脂肪酸、氨态氮、微生物蛋白浓度。结果表明：随着发酵时间的延长，对照组与试验组发酵液 pH 逐渐下降，发酵液总挥发性脂肪酸、氨态氮、微生物蛋白浓度及乙酸、丙酸、丁酸含量逐渐增加，对照组与试验组之间均无显著差异（$P>0.05$），但在 8、24 h 试验组发酵液 pH 与对照组相比有降低的趋势（$0.05 \leqslant P<0.10$），4、8、24 h 试验组 NH_3-N 浓度与对照组相比有降低的趋势（$0.05 \leqslant P<0.10$）。结果显示，在体外发酵条件下，添加 LPS 具有降低发酵液 pH 以及 NH_3-N 浓度的趋势，但这一影响并不显著。

关键词：脂多糖；奶牛；体外发酵；瘤胃发酵

中图分类号：S823

亚急性瘤胃酸中毒（SARA）是一种常见的奶牛营养代谢性疾病，奶牛饲粮精料比例过高、优质粗饲料缺乏以及应激反应等都可能引发 SARA，通常以奶牛瘤胃液 pH 持续处于 5.2~5.8 的时间超过 180 min 作为 SARA 判定的标准[1]。SARA 会严重影响奶牛健康及生产性能，如诱发其他营养代谢性疾病、降低采食量和产奶量、影响乳成分合成量及比例等。Plaizier 等[2]调查发现，约有 20%的高产泌乳奶牛患有 SARA，而北美地区奶牛业每年因 SARA 损失达 5~10 亿美元。因此，为保障奶牛健康及奶牛产业收益，有必要更加深入地探究 SARA 的发病机制。目前关于 SARA 的发病机制主要有 3 种学说：乳酸中毒学说、有机酸中毒学说以及脂多糖（lipopolysaccharides，LPS）和组胺中毒学说[3]。

收稿日期：2017-03-15

基金项目：国家“十三五”重点研发课题（2016YFD0700205,2016YFD0700201）

作者简介：唐志文（1992—），男，山西朔州人，硕士研究生，从事反刍动物营养与饲料研究。E-mail: tzwcaas@163.com

*通信作者：熊本海，研究员，博士生导师，E-mail: xiongbenhai@caas.cn

LPS又称内毒素，广泛存在于革兰氏阴性细菌外膜，在细菌快速生在或死亡裂解时都会大量释放。在当前集约化生产模式下，由于饲粮中物理有效中性洗涤纤维缺乏或进料比例过高，奶牛SARA发生的几率越来越高。当奶牛发生SARA时，瘤胃液pH显著降低，瘤胃内LPS大量增加[1,4]，而高浓度的LPS会进一步加重SARA。Steele等[5-6]研究发现，当饲喂高精料诱发SARA时，瘤胃上皮结构被破坏，这可能是高浓度LPS与低pH共同作用的结果。瘤胃上皮结构被破坏，会影响挥发性脂肪酸（VFA）等有机酸的吸收，导致其在瘤胃内大量积累。同时，瘤胃上皮结构被破坏，增加了LPS易位进入外周循环系统的可能性，一旦LPS发生易位，将会引发机体炎症反应，若发生瘤胃炎症，VFA的吸收会进一步受到抑制，再次导致瘤胃内VFA的积累。而瘤胃内VFA的大量积累会使瘤胃液pH快速下降，加重SARA。

然而，国内外对于LPS对SARA影响的研究都是基于LPS与动物机体的互作，而LPS是否会通过直接影响瘤胃微生物发酵来影响SARA病程，国内外却鲜有报道，为进一步了解SARA发病机制，有必要对此进行深入研究。Emmanuel等[7]和Chin等[8]研究发现，较低pH与高浓度LPS相互作用会增加黏膜的通透性，作者猜想较低pH与高浓度LPS相互作用也可以影响微生物细胞外膜的结构，使其活性发生改变，进而影响发酵产物。由于体内试验干扰因素众多，本试验选用体外法，探究LPS对瘤胃发酵的影响。

1. 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用的LPS选购自美国Sigma公司，规格为10 mg/支，其中LPS有效成分含量为3 000 000 EU/mg。

1.2 瘤胃液供体动物及饲养管理

在北京市诚远盛隆牛场选取4头体况良好，体重相近，安装有永久性瘤胃瘘管的荷斯坦奶牛作为瘤胃液供体动物。试验用牛饲喂该牛场常规全混合和日粮（TMR），其组成及营养水平见表1。每天07:00和19:30分2次饲喂，自由饮水，自由采食。

表1 TMR组成及营养水平（干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the TMR (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
稻草秸秆 Rice stalk	5.00

青贮玉米秸秆 Maize silage stalk	25.00
苜蓿草 Alfalfa	10.00
玉米 Corn	30.00
麸皮 Wheat bran	7.62
豆粕 Soybean meal	9.00
棉粕 Cottonseed meal	9.60
石粉 Limestone	0.90
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.90
食盐 NaCl	0.84
小苏打 $NaHCO_3$	0.54
预混料 Premix	0.60
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
泌乳净能 NE_L/(MJ/kg)	6.99
粗蛋白质 CP	16.68
粗脂肪 EE	2.45
中性洗涤纤维 NDF	32.45
钙 Ca	0.79
磷 P	0.61

每千克预混料含有 One kilogram of premix contained the following:VA 250 000 IU，VD 340 000 IU，VE 1 000 IU，Cu 1 g，Fe 5 g，Mn 4 g，Zn 5 g，Se 0.01 g，I 0.05 g，Co 0.01 g，Mg 50 g。表 3 同 The same as Table 3。

1.3 体外瘤胃发酵试验

1.3.1 人工唾液盐配制

人工唾液盐参照 Menke 等[9]方法于试验前 1 天配制，并持续通 CO_2 待用，组成见表 2。

人工唾液盐各储备液配制好后，在 400 mL 蒸馏水中依次加入 100 μL 微量元素溶液 A、200 mL 碳酸盐缓冲液 B、200 mL 磷酸盐缓冲液 C、1 mL 刃天青指示剂和 40 mL 还原液。充分混匀后持续通入 CO_2，直至溶液颜色由粉红变为无色透明，pH 调整至 6.80 为止。使用前 39 ℃预热。

表 2 人工唾液盐储备液组成

Table 2 Composition of stock solutions of artificial saliva salt

项目 Items	试剂 Regent	用量 Dosage
微量元素溶液 A Microelement solution A	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	13.2 g
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10.0 g
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1.0 g
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	8.0 g
	蒸馏水	100 mL

碳酸盐缓冲液 B Buffer bicarbonate B	NH_4HCO_3	4.0 g
	$NaHCO_3$	35.0 g
	蒸馏水	1 000 mL
磷酸盐缓冲液 C Phosphate buffer C	Na_2HPO_4	5.7 g
	KH_2PO_4	6.2 g
	$MgSO_4·7H_2O$	0.6 g
	蒸馏水	1 000 mL
刃天青指示剂 Resazurin indicator	刃天青	0.1 g
	蒸馏水	100 mL
还原液 Reduction solution	NaOH	160 mg
	$Na_2S·9H_2O$	625 mg
	蒸馏水	100 mL

1.3.2 体外发酵液

于晨饲前 2 h 进行瘤胃液采集，4 头瘘管奶牛分别采集 500 mL，瘤胃液采集后，用 4 层纱布过滤，并迅速移入预热达 39 ℃并通 CO_2 的保温瓶内，每头牛收集适量食糜置于保温瓶内，收集完毕后迅速带回实验室。在实验室内取 4 头牛瘤胃液各 250 mL，将食糜用 2 L 人工唾液冲洗 3 次，并用 4 层纱布过滤后与瘤胃液混匀，即完成体外发酵液的制备，将体外发酵液置于 39 ℃水浴锅中，持续通入 CO_2 待用。

1.3.3 体外发酵底物

发酵底物由蒸汽压片玉米、豆粕、羊草、苜蓿组成，将饲料原料 65 ℃烘干 48 h，充分研磨过 1 mm 筛，按照底物配比，称取各原料，混匀待用。发酵底物组成及营养水平见表 3。

表 3 发酵底物组成及营养水平（干物质基础）

Table 3 Composition and nutrient levels of the substrate (DM basis) %

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels	含量 Content
蒸汽压片玉米 Steam pressed Corn	40.0	干物质 DM	92.45
豆粕 Soybean meal	10.0	粗蛋白质 CP	11.34
苜蓿草 Alfalfa	15.0	中性洗涤纤维 NDF	34.41
羊草 Chinese wildrye	34.0	泌乳净能 NE_L/(MJ/kg)	6.07
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.5	钙 Ca	0.71
预混料 Premix	0.5	磷 P	0.35
合计 Total	100.0		

1.3.4 试验设计

国内外大量研究显示，当奶牛发生 SARA 时，其瘤胃内 LPS 浓度基本处于 80 000~150 000 EU/mL[10-13]，因此本试验 LPS 添加量选择 100 000 EU/mL。采用双因子完全随机试验设计，分为对照组（不添加 LPS）和试验组（添加 LPS 100 000EU/mL），分别发酵 2、4、8、

12、24 h。每组 25 个发酵瓶，每组每个时间点 5 个发酵瓶。参照 Menke 等[9]体外发酵方法，在 100 mL 发酵瓶中添加 0.5 g 发酵底物，75 mL 体外发酵液，使用恒温培养箱在 39 ℃进行培养。

1.4 样品采集及测定

分别于发酵后 2、4、8、12、24 h 取样，将样品从培养箱中取出后置于冰水中，停止发酵，然后用 pH 计立即测定 pH。将发酵液过 4 层纱布，分装于 2 支离心管中，一支按与发酵液比例添加 25%的偏磷酸溶液，混匀后于-20 ℃冷冻保存，用于 VFA 和氨态氮(NH_3-N)浓度的测定，另一支 150×*g* 离心 15 min，采集 2 管 8 mL 上清液用于微生物蛋白（MCP）的测定。瘤胃液中 NH_3-N 浓度利用靛酚比色法[14]测定，VFA 浓度利用气相色谱以外标法测定[15]，MCP 利用嘌呤法测定[16]。饲粮和底物样品干物质、粗蛋白质、粗脂肪、钙、磷含量测定使用实验室常规分析方法进行分析[17]，应用 Van Soest 等[18]的方法测定中性洗涤纤维含量。泌乳净能依据 NY/T 34-2004[19]计算。

1.5 数据统计分析

试验数据经 Excel 2016 进行初步整理后，采用 SAS 9.2 软件的 GLM 模型进行线性分析，以 P<0.05 为差异显著性的判断标准，0.05≤P<0.10 判定为有差异趋于显著。

2. 结果与分析

2.1 发酵液 pH

由表 4 可知，试验组与对照组发酵液 pH 均随着发酵时间的延长而降低。各时间点对照组与试验组无显著差异（P>0.05），但 8、24 h 2 个时间点试验组与对照组相比有降低的趋势（0.05≤P<0.10）。

表 4 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 pH 变化动态的影响

Table 4 Effects of LPS supplementation on dynamic change of pH in *in vitro* rumen fermentation fluid

项目 Items	时间 Time/h	对照组 Control group	试验组 Experimental group	SEM	*P* 值 *P*-value
pH	2	6.95	7.01	0.013	0.210
	4	6.86	6.85	0.208	0.234
	8	6.75	6.70	0.044	0.091
	12	6.71	6.68	0.150	0.167
	24	6.65	6.60	0.060	0.058

同行数据肩标不同字母表示差异显著(P<0.05)，相同字母或无字母表示差异不显著(P>0.05)。下表同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$). The same as below.

2.2 发酵液 VFA 浓度

由表 5 可知，随着发酵时间的延长，试验组与对照组发酵液乙酸、丙酸、丁酸含量和总挥发性脂肪酸（TVFA）浓度均呈上升趋势，2、4、8、12、24 h 试验组与对照组无显著差异（$P>0.05$）。随着发酵时间的延长，对照组与试验组发酵液乙酸/丙酸呈先升高后降低的趋势，且均在 12 h 达到峰值，但是试验组与对照组相比，各个时间点均无显著差异（$P>0.05$）。

表 5 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 VFA 浓度变化动态的影响

Table 5 Effects of LPS supplementation on dynamic change of VFA concentrations in *in vitro* rumen fermentation fluid

项目 Items	时间 Time/h	对照组 Control group	试验组 Experimental group	SEM	*P* 值 *P*-value
总挥发性脂肪酸 TVFA/（mmol/L）	2	122.71	124.05	1.345	0.139
	4	127.68	134.00	2.764	0.169
	8	178.89	188.95	3.503	0.266
	12	215.41	222.73	3.305	0.313
	24	239.73	247.45	5.283	0.155
乙酸 Acetic acid/%	2	43.28	42.07	0.393	0.147
	4	43.56	41.87	1.401	0.589
	8	40.43	38.56	0.971	0.369
	12	40.61	39.79	0.597	0.536
	24	38.95	37.95	0.509	0.372
丙酸 Propionic acid/%	2	24.55	24.25	0.301	0.131
	4	24.63	23.98	0.805	0.349
	8	22.67	21.93	0.511	0.513
	12	23.29	22.26	0.579	0.113
	24	23.37	23.12	0.267	0.216
丁酸 Butyric acid/%	2	25.31	24.37	0.252	0.173
	4	27.12	25.31	0.891	0.351
	8	26.95	26.32	0.595	0.627
	12	26.03	25.29	0.871	0.131
	24	27.61	26.76	0.402	0.118
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	2	1.74	1.76	0.108	0.111
	4	1.77	1.77	0.412	0.225
	8	1.79	1.81	0.057	0.112
	12	1.84	1.89	0.054	0.197
	24	1.67	1.71	0.117	0.180

2.3 发酵液 NH_3-N 浓度

由表 6 可知，试验组与对照组发酵液 NH_3-N 浓度随着发酵时间延长而逐渐升高。2、4、8、12、24 h 对照组与试验组发酵液 NH_3-N 浓度无显著差异（P＞0.05），但 4、8、24 h 3 个时间点试验组与对照组相比有降低的趋势（0.05≤P<0.10）。

表 6　添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 NH_3-N 变化动态的影响

Table 6　Effects of LPS supplementation on dynamic change of NH_3-N concentrations in *in vitro* rumen fermentation fluid　mg/dL

项目 Items	时间 Time/h	对照组 Control group	试验组 Experimental group	SEM	*P* 值 *P*-value
氨态氮 NH_3-N	2	9.99	9.25	0.852	0.157
	4	19.02	17.13	0.350	0.081
	8	23.06	21.17	0.559	0.059
	12	23.96	24.78	0.602	0.287
	24	26.20	24.98	0.567	0.093

2.4 发酵液 MCP 浓度

由表 7 可知，随着发酵时间的延长，试验组与对照组发酵液 MCP 浓度呈上升趋势。各时间点对照组与试验组发酵液 MCP 浓度无显著差异（P＞0.05）。

表 7 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 MCP 浓度变化动态的影响

Table 7　Effects of LPS supplementation on dynamic change of MCP concentrations in *in vitro* rumen fermentation fluid　mg/mL

项目 Items	时间 Time/h	对照组 Control group	试验组 Experimental group	SEM	*P* 值 *P*-value
微生物蛋白 MCP	2	11.83	11.21	0.648	0.656
	4	19.10	18.81	0.438	0.187
	8	21.66	20.08	0.204	0.267
	12	22.35	21.57	1.040	0.416
	24	23.18	21.45	2.556	0.183

3. 讨　论

3.1 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 pH 变化动态的影响

在动物体内，瘤胃液 pH 受唾液分泌量、有机酸产量、吸收速率、排出速率以及缓冲物质影响[20]，而在体外发酵过程中，发酵液 pH 主要与有机酸等酸性物质以及 NH_3-N 等碱性物质的产量有关。张建勋等[21]进行体外发酵试验时发现，随着发酵时间的延长，发酵液 pH 逐渐下降。本试验中试验组与对照组发酵液 pH 随发酵时间的延长同样呈下降趋势，这可能

是由于 VFA 等有机酸持续积累造成的。

3.2 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 VFA 变化动态的影响

乙酸、丙酸、丁酸等 VFA 是瘤胃碳水化合物发酵的主要产物，约占 TVFA 的 95%[22]，主要作用是为动物生产提供能量以及维持瘤胃环境。本试验中 TVFA、乙酸、丙酸以及丁酸浓度均呈逐渐升高的趋势，这是由于随着发酵时间的延长，VFA 浓度逐渐增加，且在密闭的发酵瓶内，没有 VFA 的吸收和排出过程。这与张建勋等[21]进行的体外发酵试验结果相同。本试验中，随着发酵时间的延长，试验组与对照组发酵液乙酸/丙酸也呈先升高后降低的趋势，这可能是由于发酵前期发酵底物纤维比例较高，微生物发酵以乙酸发酵模式为主，乙酸浓度逐渐增加，而在发酵后期，底物中纤维物质由于分解而逐渐减少，微生物发酵转为丙酸发酵模式，丙酸浓度逐渐增加[23-24]。

3.3 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 NH_3-N 变化动态的影响

反刍动物瘤胃内 NH_3-N 是饲料蛋白质、非蛋白氮以及内源蛋白质降解的产物，是瘤胃 MCP 合成的主要原料。与张建勋等[21]进行的体外发酵试验结果相同，本试验中，随着发酵时间的延长，发酵液 NH_3-N 浓度也逐渐增加，这可能是由于在瘤胃微生物的作用下，发酵瓶内 NH_3-N 浓度不断增加，且体外发酵试验相对于瘤胃内缺少了瘤胃壁的吸收及食糜的排空过程，从而造成 NH_3-N 的积累。然而欧阳克蕙等[25]进行的体外发酵试验结果显示，随着发酵时间的延长，发酵液 NH_3-N 浓度呈先升高后降低的趋势。本试验中 4、8、24 h 3 个时间点试验组相比较于对照组，发酵液 NH_3-N 浓度有降低趋势。而井龙晖等[26]给奶牛颈静脉灌注 LPS 发现,试验组瘤胃液 NH_3-N 浓度升高，推测可能是因为胃肠道移动减缓了 NH_3-N 的积累。据报道，低 pH 会影响瘤胃微生物生长，从而减缓底物发酵速率，降低 NH_3-N 生成速率[23]，本试验中 8、24 h 2 个时间点试验组 pH 比对照组有降低的趋势，这可能解释了为什么 4、8、24 h 3 个时间点试验组相比较于对照组，NH_3-N 浓度有降低趋势。

3.4 添加 LPS 对体外瘤胃发酵液 MCP 变化动态的影响

反刍动物瘤胃中的 MCP 需要经过一系列复杂的生物过程来合成，可以为动物机体提供优质的氮源，瘤胃合成的 MCP 基本可以满足动物蛋白需要量的 40%～80%。本试验中随着发酵时间的延长，MCP 浓度逐渐增加，这可能是由于发酵底物中的碳水化合物及氮源被逐步分解，瘤胃微生物利用 NH_3-N 等物质不断合成 MCP。然而本试验结果表明，添加 LPS 不

会影响发酵液中 MCP 浓度。

4 结 论

在体外发酵条件下，添加LPS具有降低发酵液pH以及NH_3-N浓度的趋势，但这一影响并不显著。

参考文献：

[1] GOZHO G N,PLAIZIER J C,KRAUSE D O,et al.Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response[J].Journal of Dairy Science,2005,88(4):1399–1403.

[2] PLAIZIER J C,KHAFIPOUR E,LI S,et al.Subacute ruminal acidosis (SARA),endotoxins and health consequences[J].Animal Feed Science and Technology,2012,172(1/2):9–21.

[3] 李冲, 石凤霞.奶牛瘤胃酸中毒机制及其营养调控措施的研究进展[J].中国饲料,2016(3):5–8.

[4] LI S,KHAFIPOUR E,KRAUSE D O,et al.Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2012,95(1):294–303.

[5] STEELE M A,CROOM J,KAHLER M,et al.Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis[J].American Journal of Physiology,Regulatory,Integrative and Comparative Physiology,2011,300(6):R1515–R1523.

[6] STEELE M A,ALZAHAL O,HOOK S E,et al.Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow:a case report[J].Acta Veterinaria Scandinavica,2009,51(1):39.

[7] EMMANUEL D G V,MADSEN K L,CHURCHILL T A,et al.Acidosis and lipopolysaccharide from Escherichia coli B:055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues[J].Journal of Dairy Science,2007,90(12):5552–5557.

[8] CHIN A C,FLYNN A N,FEDWICK J P,et al.The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions[J].Canadian Journal of Physiology and Pharmacology,2006,84(10):1043–1050.

[9] MENKE K H,RAAB L,SALEWSKI A,et al.The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*[J].The Journal of Agricultural Science,1979,93(1):217–222.

[10] GOZHO G N,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2007,90(2):856–866.

[11] EMMANUEL D G V,DUNN S M,AMETAJ B N.Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2008,91(2):606–614.

[12] KHAFIPOUR E,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation[J].Journal of Dairy Science,2009,92(3):1060–1070.

[13] KHAFIPOUR E,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation[J].Journal of Dairy Science,2009,92(4):1712–1724.

[14] BRODERICK G A,KANG J H.Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media[J].Journal of Dairy Science,1980,63(1):64–75.

[15] 戈婷婷.不同组合的功能性寡糖对锦江黄牛瘤胃体外发酵的影响[D].硕士学位论文.南昌:江西农业大学,2011.
[16] 刘晶.饲料果胶对瘤胃微生物菌群结构和微生物蛋白合成影响的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2014.
[17] 李克广, 郭全奎.饲料分析检测技术[M].北京:中国农业大学出版社,2015.
[18] VAN SOEST P J,ROBERTSON J B,LEWIS B A.Methods for dietary fiber,neutral detergent fiber,and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J].Journal of Dairy Science,1991,74(10):3583–3597.
[19] 中华人民共和国农业部.NY/T 34-2004 奶牛饲养标准[S].北京:中国农业出版社,2004.
[20] 韩昊奇, 刘大程, 高民, 等.不同NFC/NDF比对奶山羊瘤胃微生物及瘤胃pH值变化的影响[J].动物营养学报,2011,23(9):597–603.
[21] 张建勋, 刘江波, 薛白, 等.饲粮精粗比对南江黄羊瘤胃体外发酵的影响[J].动物营养学报,2013,25(4):870–877.
[22] 冯仰廉.反刍动物营养学[M].北京:科学出版社,2006.
[23] NOCEK J E,TAMMINGA S.Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition[J].Journal of Dairy Science,1991,74(10):3598–3629.
[24] DEMEYER D I.Rumen microbes and digestion of plant cell walls[J].Agriculture and Environment,1981,6(2/3):295–337.
[25] 欧阳克蕙, 张琪, 鲁友友, 等.高精料饲粮中添加烟酸对体外瘤胃发酵培养液pH及发酵参数动态变化的影响[J].动物营养学报,2014,26(1):115–124.
[26] 井龙晖

Effects of Lipopolysaccharide on Rumen Fermentation Investigated by *in Vitro* Method

TANG Zhiwen[1] JIANG Linshu[2] YANG Liang[1] WANG Kun[1] XIONG Benhai[1*]

(1. *State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*; 2. *Beijing Key Laboratory for Dairy Cow Nutrition, Beijing University of Agriculture, Beijing* 102206, China)

Abstract: This experiment was conducted to examine the effects of Lipopolysaccharide (LPS) on rumen fermentation by *in vitro* method． Four healthy Holstein cows fitted with permanent ruminal cannulas were used as the donor of rumen fluid． Two levels of LPS ［0（control group） and 100 000 EU/mL （experimental group）］ were supplemented in substrates of different groups． Samples were collected after being cultured for 2， 4， 8， 12 and 24 h, respectively, to determine pH and concentrations of volatile fatty acids, ammonia nitrogen and microbial protein of fermentation fluid. The results showed as follows: with the extension of fermentation time， fermentation fluid pH in control group and experimental group were gradually decreased，

*Corresponding author, professor, E-mail: xiongbenhai@caas.cn (责任编辑 王智航)

the concentrations of total volatile fatty acids, ammonia nitrogen and microbial protein， and contents of acetic acid, propionic acid and butyric acid were gradually increased, and compared with control group, experimental group showed no significant changes （$P>0.05$）. Compared with control group, fermentation fluid pH in experimental group showed a downward trend at 8 and 24 h ($0.05\leqslant P<0.10$), and the concentration of ammonia nitrogen showed a downward trend at 4, 8 and 24 h ($0.05\leqslant P<0.10$). The results indicate that the supplementation of LPS has a tendency to decrease pH and ammonia nitrogen concentration in fermentation fluid under *in vitro* culture conditions, but the difference is not significant.

Key words: lipopolysaccharide; cow; *in vitro* fermentation; rumen fermentation